



Mi instan



© BSN 2012

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
5 Syarat mutu	2
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara uji mi instan	4
Bibliografi	35

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Mi instan* ini merupakan revisi SNI 01-3551-2000, *Mi instan*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi industri mi instan.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 722/MENKES/PER/IX/1988, tentang Bahan Tambahan Makanan atau revisinya.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang pada Kemasan Pangan dari Plastik.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).
10. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK. 00. 05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini disusun oleh Panitia Teknis 67 – 04, *Makanan dan Minuman*, Kementerian Perindustrian, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 25 November 2011 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses pemungutan suara pada tanggal 22 Maret 2012 sampai dengan tanggal 21 April 2012 dengan hasil akhir RASNI

Mi instan

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, komposisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji mi instan.

Mi instan dicirikan dengan adanya penambahan bumbu dan memerlukan proses rehidrasi untuk siap dikonsumsi.

2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

mi instan

produk yang dibuat dari bahan baku utama tepung terigu dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lainnya dan bahan tambahan pangan yang diizinkan, dikukus, digoreng atau dikeringkan, dan matang setelah dimasak atau diseduh menggunakan air mendidih atau air panas dalam waktu singkat beserta bumbu dan atau tanpa pelengkap yang terdapat dalam kemasan

4 Komposisi

4.1 Bahan baku utama

- a. tepung terigu

4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang diizinkan untuk mi instan sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk mi instan sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Syarat mutu

Syarat mutu mi instan sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 – Syarat mutu mi instan

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	Normal
1.2	Rasa	-	Normal
1.3	Warna	-	Normal
1.4	Tekstur	-	normal
2	Benda asing ²⁾	-	tidak boleh ada
3	Keutuhan ¹⁾	% (b/b)	min. 90
4	Kadar air ¹⁾		
4.1	Proses penggorengan	% (b/b)	maks. 8
4.2	Proses pengeringan	% (b/b)	maks. 14,5
5	Kadar protein (N x 6,25) ²⁾	% (b/b)	min. 8
6	Bilangan asam ¹⁾	mg KOH / g minyak	maks. 2
7	Cemaran logam ²⁾		
7.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,1
7.2	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,3
7.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks.40
7.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
8	Cemaran arsen (As) ²⁾	mg/kg	maks. 0,1
9	Cemaran mikroba ²⁾		
9.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. 1×10^6
9.2	<i>Coliform</i>	koloni/g	maks. 1×10^2
9.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3
9.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	maks. 1×10^3
9.5	<i>Bacillus cereus</i>	koloni/g	maks. 1×10^3
9.6	Kapang dan khamir	koloni/g	maks. 1×10^4
¹⁾ Berlaku untuk keping mi			
²⁾ Berlaku untuk keping mi, bumbu dan pelengkapanya.			

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk mi instan seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
 - Cara uji tekstur sesuai Lampiran A.2.4
- Cara uji benda asing sesuai Lampiran A.3
- Cara uji keutuhan sesuai Lampiran A.4

- e) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji kadar protein sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji bilangan asam sesuai Lampiran A.7
- h) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.8
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.8.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.8.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.8.3
- i) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.9
- j) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.10
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.10.1
 - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.10.2
 - Cara uji *Coliform* sesuai Lampiran A.10.3
 - Cara uji *Escherichia coli* sesuai Lampiran A.10.4
 - Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai Lampiran A.10.5
 - Cara uji *Bacillus cereus* sesuai Lampiran A.10.6
 - Cara uji kapang dan khamir sesuai Lampiran A.10.7

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Mi instan dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A
(normatif)
Cara uji mi instan

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh mi instan dan bumbu pelengkapya ambil contoh secara aseptik sebanyak 100 g kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh mi instan dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia**A.1.3.1 Analisis keping mi**

Ambil mi instan yang mewakili contoh uji sebanyak 300 g hingga 500 g, buka kemasan kemudian hancurkan mi atau giling dengan menggunakan blender dan saring menggunakan saringan mesh no. 20. Kemudian masukkan ke dalam botol contoh yang bersih, kering dan kedap udara.

A.1.3.2 Analisis keping mi, bumbu dan pelengkapya

Ambil mi instan yang mewakili contoh uji sebanyak 300 g hingga 500 g, buka kemasan kemudian hancurkan mi instan bersama bumbu dan pelengkapya yang ada atau giling dengan menggunakan blender dan saring menggunakan saringan mesh no. 20. Kemudian masukkan ke dalam botol contoh yang bersih, kering dan kedap udara.

A.2 Keadaan**A.2.1 Bau****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tercium bau khas mi instan, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium selain bau khas mi instan, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Rasa

A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terasa khas mi instan, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) Jika tidak terasa khas mi instan, maka hasilnya dinyatakan "tidak normal".

A.2.3 Warna

A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) amati contoh uji untuk mengetahui warnanya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terlihat warna kuning hingga kuning keemasan atau warna lain sesuai dengan yang tercantum dalam label, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) Jika terlihat selain warna kuning hingga kuning keemasan atau warna lain sesuai dengan yang tercantum dalam label, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.4 Tekstur

A.2.4.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera peraba yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.4.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) amati contoh uji untuk mengetahui teksturnya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.4.3 Cara menyatakan hasil

- c) Jika tekstur terasa normal, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- d) Jika tekstur tidak normal, maka disebutkan tekstur yang diamati.

A.3 Benda asing

A.3.1 Prinsip

Contoh uji diamati secara organoleptik dengan indera penglihatan.

A.3.2 Cara kerja

- a) Periksa isi contoh secara organoleptik apakah mengandung benda lain selain mi instan misalnya: tanah, pasir dan batu-batuan.
- b) Lakukan pengamatan terhadap contoh uji tersebut untuk mengetahui adanya benda asing tersebut.

A.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Apabila tidak terlihat benda asing, maka hasil dinyatakan "tidak ada."
- b) Apabila terlihat benda asing, maka hasil analisis dinyatakan sesuai dengan pengamatan

A.4 Keutuhan

A.4.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera visual dan diukur secara gravimetri yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian.

A.4.2 Cara kerja

Buka bungkus dan timbang bobot mi keseluruhan (w), kemudian pisahkan mi yang hancur dan timbang (W_1)

A.4.3 Perhitungan

$$\text{Keutuhan (\%)} = \left(\frac{W - W_1}{W} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W adalah bobot mi keseluruhan, dinyatakan dalam gram (g);
 W_1 adalah bobot mi yang hancur, dinyatakan dalam gram (g);

A.4.4 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 2% dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 2 %, maka uji harus diulang kembali.

A.5 Kadar air

A.5.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

A.5.2 Peralatan

- Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Desikator yang berisi desikan; dan
- Pinggan alumunium tertutup dengan diameter 40 mm sampai dengan 50 mm.

A.5.3 Cara kerja

- Panaskan pinggan beserta tutupnya dalam oven pada suhu $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama kurang lebih satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (pinggan dan tutupnya) (W_0);
- masukkan 2 g sampai dengan 5 g contoh ke dalam pinggan, tutup, dan timbang (W_1);
- panaskan pinggan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup pinggan disamping pinggan di dalam oven pada suhu $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama 1 (satu) jam setelah suhu oven $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$;
- tutup pinggan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang (W_2);
- lakukan sampai bobot konstan;
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kadar air dalam contoh.

A.5.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot pinggan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.5.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 2% dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 2 %, maka uji harus diulang kembali.

A.6 Kadar protein ($N \times 6,25$)

A.6.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan H_2SO_4 menggunakan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sebagai katalis dan K_2SO_4 untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam ammonium. Garam ammonium tersebut diuraikan menjadi NH_3 pada saat destilasi menggunakan NaOH . NH_3 yang dibebaskan diikat dengan asam borat menghasilkan

ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,25.

A.6.2 Peralatan

- Labu Kjeldahl 100 mL;
- distilator dan kelengkapannya;
- pemanas listrik / alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- buret 10 mL terkalibrasi; dan
- batu didih

A.6.3 Pereaksi

- Asam sulfat, H_2SO_4 ;
- Larutan katalis tembaga, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ bebas nitrogen 0,05 g/mL H_2O ;
larutkan 5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan air suling menjadi 100 mL, lalu pindahkan dalam botol bertutup gelas;
- Katalis selen
campurkan 4 g serbuk SeO_2 , 150 g K_2SO_4 atau Na_2SO_4 anhidrat dan 30 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- Kalium sulfat, K_2SO_4 bebas nitrogen;
- Larutan *indicator methyl red* (MR) dan *bromocresol green* (BCG);
larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95% menjadi 100 mL. Larutkan 1 g *bromocresol green* dengan etanol 95% menjadi 500 mL. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan dalam botol bertutup gelas.
- Larutan asam borat, H_3BO_3 4%;
larutkan 40 g H_3BO_3 dengan air suling menjadi 1 000 mL dan tambahkan 3 mL larutan *indicator methyl red / bromocresol green*, aduk (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- Larutan natrium hidroksida, NaOH 30%;
larutkan 600 g hablur NaOH dengan air suling menjadi 2 000 mL, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- Larutan *indicator fenolftalein* (PP) 1 %; dan
larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95%, dan encerkan menjadi 100 mL.
- Larutan asam klorida, HCl 0,1 M.
pipet dengan hati-hati 8,60 mL HCl pekat (36,5% sampai dengan 38%) ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan tentukan normalitasnya.

A.6.4 Cara kerja

- Timbang 1 g contoh ke dalam labu Kjeldahl, tambahkan 15,00 g K_2SO_4 , 1 mL larutan katalis $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ atau 1 g campuran katalis selen, 8 butir sampai dengan 10 butir batu didih dan 25 mL H_2SO_4 pekat;
- panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit penghisapan asap;
- biarkan dingin, lalu encerkan dengan air suling secukupnya;
- tambahkan 75 mL larutan NaOH 30% (periksa dengan indikator PP sehingga larutan menjadi basa;
- sulingkan selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 mL, dengan penampungan destilat adalah 50 mL larutan H_3BO_3 4%;
- bilas ujung pendingin dengan air suling;
- titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,1 M; dan

h) kerjakan penetapan blanko.

A.6.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,25 \times 100 \%}{W}$$

Keterangan:

V_1 adalah volume HCl 0,1 M untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);

V_2 adalah volume HCl 0,1M untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL);

N adalah normalitas larutan HCl, dinyatakan dalam Normalitas (N);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);

14,007 adalah bobot atom Nitrogen;

6,25 adalah faktor konversi untuk protein.

A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil kadar protein. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

A.7 Bilangan Asam

A.7.1 Prinsip

Pelarutan contoh dalam pelarut organik dan dinetralkan dengan larutan basa (kalium hidroksida atau natrium hidroksida).

A.7.2 Peralatan

- Rotary evaporator* atau pendingin tegak;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas air;
- Gelas piala 500 mL,
- Buret 10 mL atau 50 mL, terkalibrasi; dan
- Labu Erlenmeyer 250 mL, yang dilengkapi dengan pendingin refluks.

A.7.3 Pereaksi

- Petroleum eter;
- Etanol netral;
etanol 95 % ditambah dengan beberapa tetes indikator pp dan di titar dengan NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda.
- Indikator fenolftalein (pp) 1 %; dan
larutkan 1 g fenolftalein dengan etanol 95 % ke dalam labu ukur 100 mL kemudian tepatkan sampai tanda garis.
- Larutan Kalium Hidroksida, KOH 0,1 N atau Larutan Natrium Hidroksida, NaOH 0,1 N yang telah distandardisasi.

A.7.4 Cara kerja

- Timbang 50 g mi yang telah dihaluskan dan tuang ke dalam gelas piala 500 mL, tambahkan 200 mL petroleum eter (45 °C -55 °C b.p), aduk rata dan sisihkan selama 10 menit.

- b) pisahkan filtrat dengan penyaringan dan uapkan pelarut menggunakan *rotary evaporator* atau pendingin tegak pada suhu 50 °C – 55 °C sampai menguap sempurna. Untuk menghilangkan sisa atau residu pelarut dapat diuapkan dengan oven vakum.
- c) timbang ekstrak (W) dan larutkan dengan 50 mL etanol panas yang telah dinetralkan;
- d) tambahkan 2 mL larutan fenolftalein sebagai indikator; dan
- e) titrasi larutan tersebut dengan KOH 0,1 N atau NaOH 0,1 N (N) sampai terbentuk warna merah muda (V_1).
- f) lakukan juga titrasi larutan blanko dengan KOH 0,1 N atau NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda (V_0).

A.7.5 Perhitungan

$$\text{Bilangan asam (mg KOH/g minyak)} = \frac{(V_1 - V_0) \times N \times 56,1}{W}$$

Keterangan:

- V_0 adalah volume KOH atau NaOH yang diperlukan dalam penitrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- V_1 adalah volume KOH atau NaOH yang diperlukan dalam penitrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- N adalah normalitas larutan KOH atau NaOH, dinyatakan dalam normal (N);
- W adalah bobot contoh yang diuji, dinyatakan dalam gram (g);
- 56,1 adalah bobot setara KOH

A.8 Cemarkan logam

A.8.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.8.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.8.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik
- e) Penangas air;
- f) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- g) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur kapasitas 10 mL;
- i) Gelas piala 250 mL;
- j) Botol polipropilen;
- k) Cawan porselen/platina/kuarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- l) Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 sampai dengan 25 µm.

A.8.1.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam klorida, HCl pekat;
- c) Larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO_3 pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis atau bisa digunakan larutan baku Cd 1000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- f) Larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- g) Larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,4 $\mu\text{g/mL}$; 0,8 $\mu\text{g/mL}$; 1,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,8 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- i) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis. atau bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- j) Larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Pb.
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,0 $\mu\text{g/mL}$ Pb.

A.8.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (w) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/ kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;

- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$ kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO_3 0,1 N 20 mL – 30 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan aquabides (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.8.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{w} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
- w adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.8.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.8.2 Timah (Sn)

A.8.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.8.2.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL dan 50 mL, terkalibrasi;
- g) Pipet ukur berskala 0,1 mL terkalibrasi;
- h) Labu Erlenmeyer 250 mL;
- i) Gelas ukur 50 mL; dan
- j) Gelas piala 250 mL.

A.8.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- Asam nitrat, HNO₃ pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan baku 1 000 mg/mL Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL aquabides, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.
Pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1000 mg/mL Sn dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

A.8.2.4 Cara Kerja

- Timbang contoh 10 g sampai dengan 20 g (w) dengan teliti ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat labu Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas labu Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh.

A.8.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{w} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- w adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.8.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

A.8.3 Merkuri (Hg)

A.8.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

A.8.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Tabung destruksi;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, dan 100 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- Gelas piala 500 mL.

A.8.3.3 Perekasi

- Larutan asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- Larutan asam nitrat, HNO_3 7 M;
- Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan natrium molibdat, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2%;
- Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL aquabides dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian 67 tambahkan mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,135 4 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
pipet 1 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Hg; dan
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 $\mu\text{g/mL}$; 0,005 $\mu\text{g/mL}$; 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Hg; dan
- l) Batu didih.

A.8.3.4 Cara kerja

A.8.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (w) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2%, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1) melalui pendingin,
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.8.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (w) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;

- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.8.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg), (mg/kg)} = \frac{C}{w} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- w adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran

A.8.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

A.9 Cemarkan arsen (As)

A.9.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

A.9.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) *Microwave digester*;
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) Pemanas listrik;
- f) *Burner* atau *bunsen*;
- g) Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- h) Labu terbuat dari borosiklat berdasar bulat 50 mL.
- i) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- j) Gelas ukur 25 mL;
- k) Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- l) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- m) Cawan porselen kapasitas 50 mL; dan
- n) Gelas piala 200 mL.

A.9.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- c) Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- d) Ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- f) Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis ke dalam labu ukur 500 mL.
- g) Larutan asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) Larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10%;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan kalium iodida, KI 20%;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- k) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20% dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku As 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- m) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan standar arsen 100 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- n) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.9.4 Cara kerja

A.9.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (w) kedalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan HClO_4 , tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;

- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.9.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (w) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450°C (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$; 0,05 $\mu\text{g/mL}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.9.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As), (mg/kg)} = \frac{C}{w} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
w adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
fp adalah faktor pengenceran.

A.9.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

A.10 Cemarkan mikroba

A.10.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji *Coliform*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*

A.10.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.10.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Pemanas listrik;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Labu Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* atau *pipettors*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting dan spatula steril.

A.10.1.3 Larutan pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- aquabides 500 mL

Larutkan bahan-bahan di atas dan atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan aquabides. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer, 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 mL dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.10.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.10.2 Angka lempeng total

A.10.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.10.2.2 Peralatan

- a) Inkubator (30 ± 1) °C terkalibrasi;
- b) Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- c) Otoklaf;
- d) Penangas air bersirkulasi (45 ± 1) °C;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) Botol pengencer 160 mL, terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- g) Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* atau *pipettor*; dan
- h) Cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

A.10.2.3 Pembenihan dan pengencerana) *Buffered peptone water* (BPW)

- | | |
|----------------------------|-------|
| – Peptone | 10 g |
| – Natrium klorida | 5 g |
| – Disodium hidrogen fosfat | 3,5 g |
| – Kalium dihidrogen fosfat | 1,5 g |
| – Air suling | 1 L |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

b) Peptone 0,1 %

- Peptone 1 g
- Air Suling 1 L

Larutkan bahan-bahan dalam 1 L air suling, atur pH 7,0, masukkan 225 mL atau 450 mL ke dalam botol (labu) 500 mL dan 9 mL ke dalam tabung reaksi. Sterilkan pada suhu 121 °C selama 20 menit.

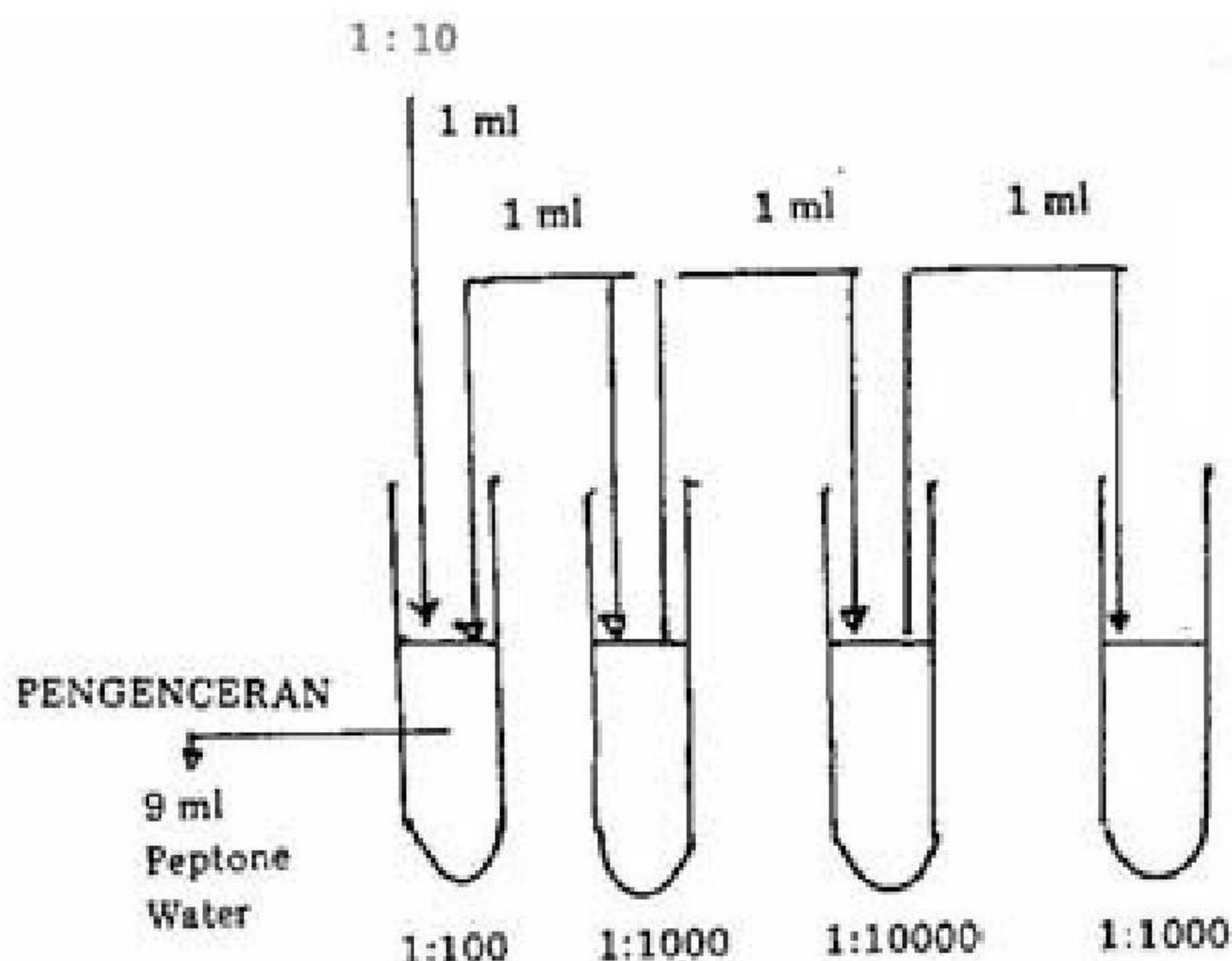
c) *Plate count agar* (PCA)

- | | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| – <i>Yeast extract</i> | 2,5 g |
| – <i>Pancreatic digest of caseine</i> | 5 g |
| – Glukosa | 1 g |
| – Agar | 15 sampai dengan 20 g |
| – Air suling | 1 L |

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

A.10.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 25 g contoh, masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar A.1.



Gambar A.1 - Metoda pengenceran

- Pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran 10^1 - 10^5 ke dalam cawan petri steril secara duplo.
- Ke dalam setiap cawan petri tuangkan sebanyak 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
- Goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan.
- Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
- Biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku.
- Masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengeram dan inkubasikan pada suhu $30 ^\circ\text{C}$ selama 72 jam.
- Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung (25 - 250) koloni setelah 48 jam.
- Hitung angka lempeng total dalam 1 g contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

A.10.2.5 Pernyataan hasil

A.10.2.5.1 Cara menghitung

- Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{\left[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2} \right]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$ALT = \frac{\sum C}{\left[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d \right]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
 n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua; dan
d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{\left[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2} \right]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2 contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6.500.000 (6,5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5.900.000 (5,9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni yang merambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu rantai, dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.10.2.5.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- Jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- Jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.10.3 Coliform

A.10.3.1 Prinsip

Pertumbuhan *Coliform* setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 35 °C, kemudian dilakukan uji penegasan menggunakan tabung BGLB *broth*.

A.10.3.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi bulb dan pipettor; dan
- Cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

A.10.3.3 Perbenihan, pengencer dan pereaksi

- Violet red bile agar* (VRBA);

- yeast extract	3	g
- pepton atau gelysate	7	g
- sodium klorida	5	g
- garam bile no.3	1,5	g
- laktosa	10	g
- neutral red	0,03	g
- crystal violet	0,002	g
- agar	15	g
- air suling	1 000	mL

Masukkan bahan-bahan di atas ke dalam 1 000 mL air suling, panaskan sampai mendidih hingga semua bahan larut. Sterilkan pada suhu 121 °C, selama 5 menit dan tepatkan pH akhir (7,4±0,2).

- brilliant green lactose bile* (BGLB) *broth* 2%; dan
- tryptic soy agar*.

A.10.3.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.10.1;
- inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} ke dalam cawan petri dan tuang dengan 10 mL VRBA bersuhu 48 °C, kemudian goyang cawan untuk meratakan. Biarkan memadat, kemudian tuang lagi dengan 5 mL VRBA, dinginkan dan biarkan memadat. Lakukan duplo;
- jika pengkayaan diperlukan, tuangkan 8 mL sampai dengan 10 mL *tryptic soy agar* sebagai lapisan dasar dan kondisikan suhu 48 °C. Goyang cawan hingga agar rata

- kemudian inkubasi pada suhu ruang selama $(2 \pm 0,5)$ jam. Kemudian lapisi dengan 8 ml sampai dengan 10 mLVRBA cair kemudian diamkan hingga membeku dan memadat;
- d) balikkan cawan dan inkubasikan pada 18 jam sampai dengan 24 jam pada 35°C ;
 - e) amati cawan di bawah peninaran kaca pembesar. Hitung koloni warna ungu kemerahan yang berdiameter 0,5 mm atau lebih besar dan dikelilingi oleh gumpalan asam *bile*. Koloni cawan harus berjumlah sekitar 25 koloni sampai dengan 250 koloni. Kemudian dilanjutkan dengan uji penegasan untuk koloni yang positif;
 - f) uji penegasan dilakukan dengan memindahkan sedikitnya 10 mata ose koloni yang mewakili, pindahkan masing-masing koloni ke dalam tabung BGLB *broth*;
 - g) inkubasikan tabung pada 35°C . Amati setelah 24 sampai dengan 48 jam terhadap terbentuknya gas; dan
 - h) tabung yang menghasilkan gas dianggap sebagai positif *Coliform*.

A.10.3.5 Perhitungan

$$\text{Coliform (koloni/g)} = n \times \frac{a}{b} \times F$$

Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g) yang diduga sebagai *Coliform*;
- a adalah jumlah koloni yang sudah ditegaskan sebagai *Coliform* (ditunjukkan dengan pembentukan gas pada tabung BGLB);
- b adalah jumlah koloni yang diambil dari koloni yang diduga sebagai *Coliform*;
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.10.3.6 Pernyataan hasil

A.10.3.6.1 Cara menghitung

Hitung koloni *Coliform* sesuai dengan A.10.2.6.1.

A.10.3.6.2 Cara membulatkan angka

Cara membulatkan angka pada hasil perhitungan *Coliform* sesuai dengan A.10.2.6.2.

A.10.4 *Escherichia coli*

A.10.4.1 Prinsip

Pertumbuhan *Escherichia coli* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.10.4.2 Peralatan

- a) Inkubator $(35 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, terkalibrasi;
- b) Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$;
- c) Rak untuk tabung reaksi;
- d) Pipet ukur 10 mL berskala 1 mL dan 1 ml berskala 0,1 mL steril;
- e) Botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- f) Tabung reaksi
- g) Tabung *Durham*;
- h) Cawan petri gelas/plastik steril (ukuran 15 mm x 100 mm atau 15 mm x 90 mm); dan
- i) Jarum Ose, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.10.4.3 Pembenihan, pengencer dan pereaksi

- Lauryl sulfate tryptose (LST) broth / Lauryl tryptose (LT) broth*;
- Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2%*;
- Escherichia coli (EC) broth*;
- Agar *Levine's eosin methylene blue (L-EMB)*;
- Plate count agar (PCA)* atau NA;
- Gram stain*;
- Tryptone (tryptophane) broth*;
- Pereaksi *Kovacs'*;
- Methyl red – Voges Proskauer (MR – VP) broth*;
- Pereaksi *Voges Proskauer*;
- Larutan merah metil;
- Koser's citrate broth*;
- Peptone diluents 0,1%*;
- Pereaksi indol;
- Larutan kalium hidroksida, KOH 40%;
- Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*;
- Larutan *alfa naftol 5%*; dan
- Kristal kreatin.

A.10.4.4 Cara kerja

A.10.4.4.1 APM – Uji pendugaan untuk *Escherichia coli*

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.10.1;
- inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* yang didalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama (48 ± 2) jam;
- amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

A.10.4.4.2 APM – Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- Pindahkan satu Ose dari setiap tabung *LST broth* yang positif ke dalam tabung *EC broth* yang berlainan,
- inkubasikan tabung-tabung *EC broth* tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama (24 ± 2) jam pada suhu $(45,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan "positif",
- apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- (48 ± 2) . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan "positif", dan
- lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

A.10.4.4.3 APM – Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- Kocok tabung-tabung *EC broth* yang positif secara hati-hati,

- b) ambil koloni sebesar satu mata Ose, kemudian digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimal 0,5 cm,
- c) inkubasikan cawan agar L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$,
- d) periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna gelap dengan atau tanpa kilat logam,
- e) dari tiap cawan agar L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang diduga *E. coli* pada tabung agar miring PCA/NA,
- f) inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ dan gunakan untuk uji selanjutnya,
- g) buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E coli* adalah gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti dibawah ini serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST *broth* untuk menegaskan adanya produksi gas,
 - uji indol
 - Inokulasi tabung *tryptophane broth* dari setiap tabung PCA/NA,
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$,
 - uji terbentuknya indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs', dan
 - uji indol adalah positif bila terbentuk warna merah pada lapisan atas.
 - uji *Voges Proskauer*
 - Inokulasi tabung medium MR-VP *broth* dari setiap tabung PCA/NA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$,
 - pindahkan 1 mL biakan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril,
 - tambahkan 0,6 mL larutan *alfa naftol* 5% dalam alkohol dan 0,2 mL larutan KOH 40% serta beberapa butir kristal kreatin, dan
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - uji merah metil
 - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
 - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung, dan
 - uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah dan negatif bila terbentuk warna kuning.
 - uji sitrat
 - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain,
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$, dan
 - uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
 - Uji pembentukan gas dari *Lactose*
 - Inokulasikan tabung LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$, dan
 - periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.10.4.4.4 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.1 – Reaksi biokimia *E. coli* pada uji IMVIC

<i>Escherichia coli</i>	Indol	Merah metil	Voges Proskaeur	Sitrat
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- a) Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila :
- uji IMVIC mengikuti pola + + - - atau - + - - sesuai dengan Tabel A.1,
 - pewarnaan gram menunjukkan gram negatif bentuk batang tidak berspora; dan
 - terbentuknya gas dalam LST *broth* dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35°C
- b) Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.2 – APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3,0	2	2	0	21
0	0	1	3,0	2	2	1	28
0	1	0	3,0	2	2	2	35
0	1	1	6,1	2	3	0	29
0	2	0	6,2	2	3	1	36
0	3	0	9,4	3	0	0	23
1	0	0	3,6	3	0	1	39
1	0	1	7,2	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7,4	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	9,2	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

A.10.5 *Staphylococcus aureus*

A.10.5.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulasi.

A.10.5.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- b) Oven/alat sterilisasi kering, terkalibrasi;
- c) Batang penyebar steril dari gelas;
- d) Botol pengencer 500 mL;
- e) Pipet ukur 10 mL dan 1 mL;
- f) Tabung reaksi;
- g) Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- h) Jarum Ose.

A.10.5.3 Pembenihan dan pereaksi

- a) *Baird-parker agar* (BPA);
- b) *Brain heart infusion broth* (BHIB); dan
- c) Plasma koagulase (dari kelinci).

A.10.5.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.10.1;
- b) pipet 1 mL larutan contoh ke dalam 3 cawan petri berisi media BPA (misalkan 1 mL dibagi menjadi 0,3 mL; 0,3 mL; dan 0,4 mL larutan contoh);
- c) sebarkan contoh secara merata dengan menggunakan batang penyebar steril. Tahan cawan dalam posisi tegak lurus sampai contoh diserap oleh media (± 10 menit). Jika contoh tidak mudah terserap oleh media, tempatkan cawan petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan petri dibalik;
- d) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam; dan
- e) pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai dengan 200 koloni dan hitung koloni yang diduga sebagai *Staphylococcus aureus*, yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum Ose.

A.10.5.5 Uji koagulasi

- a) Pindahkan 5 koloni sampai dengan 10 koloni yang diduga sebagai *Staphylococcus aureus* ke dalam tabung berisi 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL BHIB;
- b) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam;
- c) tambahkan plasma koagulase kelinci sebanyak 0,5 mL ke dalam biakan BHIB dan campur;
- d) inkubasikan campuran plasma koagulase kelinci dengan biakan BHIB pada 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam, kemudian amati terbentuknya penggumpalan setiap 6 jam. *Staphylococcus aureus* positif apabila terbentuk gumpalan yang kokoh dan utuh serta dapat bertahan dalam tabung ketika dibalikkan;
- e) amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi, lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi;
- f) ratakan koloni (n) dari ketiga cawan petri yang diwakili oleh koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengencernya (F); dan

- g) hitung jumlah *Staphylococcus aureus* dalam 1 g contoh.

A.10.5.6 Perhitungan

$$\text{Staphylococcus aureus (koloni/g)} = n \times \frac{B}{A} \times F$$

Keterangan:

- n adalah jumlah koloni, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
 A adalah jumlah koloni yang diambil dari koloni yang positif *S. aureus*;
 B adalah jumlah koloni yang sudah ditegaskan sebagai *S. aureus*; dan
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.10.6 *Bacillus cereus*

A.10.6.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* ditandai dengan terbentuknya koloni eosin merah muda penghasil *lechitinase*, yang diikuti dengan uji penegasan pada berbagai media.

A.10.6.2 Peralatan

- Inkubator (30 ± 2) °C dan (35 ± 2) °C terkalibrasi;
- Alat homogenisasi yang sesuai dengan kecepatan putaran 18 000 rpm sampai dengan 21 000 rpm;
- Penangas air, (48 – 50) °C;
- Mikroskop, *mikroscope slides*, dan *cover slips*;
- Alat penghitung koloni;
- Vorteks mixer*;
- Bunsen* besar dan kecil;
- Rak tabung biakan;
- Botol pengencer steril;
- Tabung anaerobik *GasPak*, dilengkapi dengan H₂ dan CO₂ *generator envelopes* dan katalisnya;
- Tabung biakan (ukuran 13 x 100 mm) steril;
- Pipet ukur 10 mL, 5 mL, dan 1 mL, berskala 0,1 mL steril;
- Cawan petri berukuran minimal 15 x 100 mm steril;
- Batang penyebar steril, diameter 3 mm sampai dengan 4 mm dengan area sebaran 45 mm sampai dengan 55 mm;
- Jarum ose, berukuran 2 mm dan 3 mm; dan
- Pena penanda.

A.10.6.3 Media dan pereaksi

- Agar mannitol-egg yolk-polymyxin* (MYP);
- Egg yolk emulsion*, 50%;
- Trypticase soy-polymyxin broth*;
- Larutan polimiksin B untuk agar MYP (0,1%) dan *trypticase soy-polymyxin broth* (0,15 %);
- Lisozim 0,001%;
- Phenol red glucose broth*;
- Agar tirosin;
- Lysozyme broth*;
- Media *Voges-proskauer*;
- Nutrient broth*;

- k) *Nitrate broth*;
- l) *Nutrient agar* (NA) untuk *B. Cereus*;
- m) Pereaksi *sulfanilic acid*;
- n) Pereaksi alfa naftol;
- o) *Butterfield's phosphate-buffered dilution water* (BPB) yang disterilkan dalam botol dengan volume akhir (450 ± 5) mL dan (90 ± 2) mL ;
- p) Pereaksi uji *Voges-Proskauer*;
- q) Larutan kalium hidroksida, KOH 40%;
- r) Kristal kreatin; dan
- s) Metanol.

A.10.6.4 Persiapan contoh

- a) Timbang 50 g contoh ke dalam blender yang bersih dan steril secara aseptis, secara aseptis tambahkan 450 mL *butterfield's phosphate-buffered dilution water* (BPB) (1:10) dan kocok selama 2 menit pada kecepatan tinggi (18 000 rpm sampai dengan 21 000 rpm); dan
- b) buat seri pengenceran dengan menggunakan larutan BPB (1:10).

A.10.6.5 Penetapan *Bacillus cereus*

A.10.6.5.1 Penetapan *Bacillus cereus*

- a) Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-6} dengan memindahkan 10 mL contoh yang telah dihomogenkan ke dalam 90 mL larutan pengencer, aduk dengan kuat dan lanjutkan ke pengenceran 10^{-6} ;
- b) Inokulasi sebanyak 0,1 mL masing-masing tingkat pengenceran (termasuk 1:10) menggunakan batang penyebar steril di atas permukaan media agar MYP, lakukan secara duplo;
- c) Inkubasi media agar MYP pada suhu 30 °C selama 24 jam;
- d) amati koloni yang dikelilingi oleh zona endapan yang menunjukkan bahwa *B. cereus* menghasilkan *lecithinase* berwarna merah muda. Warnanya akan menjadi lebih jelas apabila inkubasi dilanjutkan;
- e) jika warna merah muda tidak jelas, lanjutkan inkubasi selama 24 jam lagi sebelum perhitungan koloni,
- f) pilih media yang mengandung 15 koloni sampai dengan 150 koloni eosin merah muda penghasil *lecithinase*;
- g) beri tanda di bagian dasar cawan petri berdasarkan zona yang terbentuk menggunakan pena penanda untuk memudahkan perhitungan dan penjumlahan koloni *B. Cereus*;
- h) ambil 5 atau lebih koloni yang positif mengandung *B. cereus* dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk penegasan *B.cereus* sesuai dengan A.10.6.6; dan
- i) hitunglah jumlah *B.cereus* per gram contoh berdasarkan persentase koloni yang telah diuji dan ditegaskan sebagai *B. cereus*.

$$B. cereus \text{ (koloni/g)} = n \times \frac{B}{A} \times F \times 10$$

Keterangan :

n adalah jumlah rata-rata koloni pada satu tingkat pengenceran;

A adalah jumlah koloni yang diambil dari koloni yang positif *B. cereus*;

B adalah jumlah koloni yang sudah ditegaskan sebagai *B. cereus*;

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai;

10 adalah faktor pengenceran dari jumlah koloni yang diinokulasi (0,1 mL).

Contoh perhitungan:

Jika jumlah rata-rata yang diperoleh pada pengenceran 10^{-3} adalah 65 dan 4 dari 5 koloni telah diuji dan ditegaskan sebagai *B. cereus* maka :

$$B. cereus \text{ (koloni/g)} = 65 \times 4/5 \times 1\,000 \times 10 = 520.000$$

A.10.6.6 Uji penegasan untuk *Bacillus cereus*

A.10.6.6.1 Biakan campuran

- Ambil 5 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lechitinase* positif dari media MYP agar dan pindahkan ke media agar miring untuk konfirmasi *B. cereus*;
- inkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C;
- lakukan pengamatan secara mikroskopis, disertai pewarnaan gram. *Bacillus cereus* akan tampak berbentuk batang besar, gram positif, dengan rantai pendek hingga panjang, spora berbentuk ellips, letaknya ditengah sampai sub terminal dan spora tersebut tidak menggembungkan sporangium;
- pindahkan biakan dengan Ose 3 mm dari setiap agar miring ke tabung (13 x 100) mm yang mengandung 0,5 mL larutan BPB steril kemudian dikocok dengan vorteks, untuk mensuspensikan biakan; dan
- suspensi biakan ini digunakan untuk konfirmasi *B. cereus* berikut:

A.10.6.6.2 Uji *phenol red glucose broth*

- Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm ke dalam 3 mL *phenol red glucose broth* dalam tabung;
- inkubasi tabung tersebut secara anaerobik selama 24 jam pada suhu 35 °C dalam tabung anaerobik GasPak; dan
- kocok tabung tersebut dengan kuat dan amati pertumbuhan *B. cereus* yang ditandai oleh peningkatan kekeruhan dan perubahan warna dari merah ke kuning yang menunjukkan bahwa asam telah dihasilkan secara anaerobik dari glukosa. Perubahan warna dari merah ke orange/kuning bisa terjadi pada sebagian tabung kontrol yang tidak diinokulasi. Hal ini disebabkan oleh terjadinya pengurangan pH akibat pemaparan media oleh CO₂ yang terbentuk dalam tabung anaerobik GasPak. Gunakan kontrol positif dan kontrol negatif untuk menyakinkan perbedaan antara reaksi positif dan positif palsu.

A.10.6.6.3 Uji *nitrate broth*

- Inokulasikan 5 mL suspensi biakan menggunakan jarum Ose 3 mm;
- inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- untuk uji nitrit, tambahkan 0,25 mL masing-masing pereaksi *sulfanilic acid* dan pereaksi alfa naftol ke dalam setiap tabung; dan
- warna oranye yang terbentuk dalam 10 menit menunjukkan bahwa nitrat telah direduksi menjadi nitrit.

A.10.6.6.4 Uji media *modified VP*

- Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 3 mm ke dalam 5 mL media VP dalam tabung;
- inkubasi tabung tersebut selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
- untuk uji terbentuknya *acetylmethyl-carbinol*, pipet 1 mL biakan ke dalam tabung uji (16 x 125) mm, tambahkan 0,6 mm larutan alfa naftol, dan 0,2 mL KOH 40%;
- aduk dan tambahkan sedikit kristal kreatin;
- amati setelah didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang; dan
- uji media *modified VP* positif apabila terbentuk warna merah muda atau violet.

A.10.6.6.5 Uji agar tirosin

- Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 3 mm ke seluruh permukaan media miring agar tirosin;
- inkubasi media miring tersebut selama 48 jam pada suhu 35 °C;
- amati zona bening sekitar pertumbuhan bakteri yang terbentuk yang menunjukkan bahwa tirosin telah terdekomposisi; dan
- jika hasil uji negatif maka inkubasi dilanjutkan selama 7 hari sebelum hasil dinyatakan negatif.

A.10.6.6.6 Uji lysozyme broth

- Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm ke dalam 2,5 mL *nutrient broth* yang mengandung 0,001% lisozim;
- inokulasikan juga suspensi biakan ke dalam 2,5 mL *nutrient broth* sebagai kontrol positif;
- inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- amati pertumbuhan dalam *lysozyme broth* dan dalam kontrol *nutrient broth*; dan
- inkubasi tabung yang negatif selama 24 jam lagi sebelum dibuang.

A.10.6.6.7 Uji agar MYP

- Uji ini tidak diperlukan apabila hasil uji telah jelas dengan menggunakan media agar MYP dan tidak ada gangguan dari mikroorganisme yang lain;
- bagi bagian dasar cawan petri menjadi 6 bagian sampai dengan 8 bagian yang sama menggunakan pena penanda;
- inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm di setiap bagian agar MYP tersebut dengan cara menyentuh permukaan agar MYP secara hati-hati. Dalam satu cawan petri dapat diuji 6 atau lebih biakan;
- biarkan inokulum diserap sempurna sebelum diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- amati terbentuknya *lecitinase* yang ditunjukkan oleh zona presipitasi disekitar pertumbuhan;
- mannitol tidak difermentasi oleh isolat jika media tempat tumbuh dan sekitarnya berwarna eosin merah muda. Warna kuning menunjukkan terbentuknya asam dari mannitol; dan
- koloni *Bacillus cereus* biasanya positif *lechitinase* dan negatif mannitol pada agar MYP.

A.10.6.6.8 Hasil uji penegasan *Bacillus cereus*

Hasil uji penegasan sebagai *B. cereus* apabila:

- Menghasilkan gram positif dengan spora yang tidak sebesar sporangium;
- menghasilkan *lechitinase* dan tidak memfermentasikan manitol dalam media agar MYP;
- tumbuh dan menghasilkan asam dari glukosa secara anaerobik;
- mereduksi nitrat menjadi nitrit;
- menghasilkan *acetylmethylcarbinol*;
- menguraikan L-tirosin; dan
- tumbuh dalam media yang mengandung lisozim 0,001%.

A.10.7 Kapang dan khamir**A.10.7.1 Prinsip**

Pertumbuhan kapang dan khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu (25 ± 1) °C selama 5 hari.

A.10.7.2 Peralatan

- a) Inkubator (25 ± 1) °C, terkalibrasi;
- b) Otoklaf;
- c) Penangas air (45 ± 1) °C;
- d) pH meter
- e) Alat penghitung koloni;
- f) Pipet ukur 10 mL dan 1 mL;
- g) Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 100 mm), steril; dan
- h) *Bent glass rod*.

A.10.7.3 Pembenihan, pengencer, dan pereaksi

- a) Agar *Dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC);
- b) Agar *Dichloran 18% glycerol* (DG 18);
- c) Larutan pepton 0,1 %; dan
 - Pepton 1 g
 - Air suling 1 000 mL

Larutkan pepton dalam air suling, kemudian sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, dan atur pH sehingga mencapai pH akhir ($7,0 \pm 0,2$).

- d) Larutan antibiotik.

Antibiotik ditambahkan dalam media kapang dan khamir untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil selama proses dalam otoklaf. Konsentrasi antibiotik yang dianjurkan adalah 100 mg/L media. Jika terlihat pertumbuhan bakteri yang berlebihan, siapkan media dengan penambahan *chloramphenicol* 50 mg/L sebelum otoklaf dan *chlortetracycline* 50 mg/L steril saat media mulai dikondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

A.10.7.4 Persiapan dan homogenisasi contoh

- a) Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pepton 0,1 % steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) Kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.10.7.5 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-6} , dengan menggunakan larutan pepton 0,1 %;
- c) Persiapan media dalam cawan dapat dilakukan dengan salah satu metode di bawah ini, yaitu:
 - metode sebar (media DRBC atau DG 18), penggunaan media DG 18 lebih sesuai untuk contoh uji yang mempunyai a_w kurang dari 0,95 :
pipet 0,1 mL masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media dan sebarkan merata dengan menggunakan *bent glass rod*.
 - metode tuang (media DG 18) :
 - Pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media;
 - campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam selama 1 menit sampai dengan 2 menit; dan
 - biarkan hingga campuran dalam cawan petri memadat.
- d) masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- e) hitung koloni pada cawan setelah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam. Jangan menghitung koloni dalam

cawan sampai batas waktu inkubasi berakhir, karena merubah posisi cawan dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder dari spora; dan

f) nyatakan hasil perhitungan sebagai koloni per gram contoh.

A.10.7.6 Pernyataan hasil

Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10 koloni - 150 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah kapang per g.

Keterangan:

- (1) Koloni kapang biasanya buram dan berbulu.
- (2) Koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam).
- (3) Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang.



Bibliografi

American Oil Chemists' Society. 1993. *AOCS Official Method Ca 5a-40, Free Fatty Acids*. 4th Edition.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods: Atomic Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18th Edition, Chapter 9.1.09.

Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.

Association of Official Analytical Chemistry. 2007. *AOAC Official Method 930.25., Protein in Macaroni Products*. 18th Edition, Chapter 32.5.07.

Association of Official Analytical Chemistry. 2007. *AOAC Official Method 926.07., Solids (Total) and Moisture in Macaroni Products, Air Oven Method*. 18th Edition, Chapter 32.5.02.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Bacillus cereus*. Chapter 14.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Mold, Yeast and Mycotoxin*. Chapter 18.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Staphylococcus aureus*. Chapter 12.

ISO 4833:2003 (E). Microbial of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for The Enumeration of Microorganism – Colony Count Technique at 30 °C.

SNI 7387:2009, Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan.

SNI 7388:2009, Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.